



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **02207099 A**(43) Date of publication of application: **16 . 08 . 90**

(51) Int. Cl.

C07K 7/10
A61K 37/24
A61K 37/24
C07K 15/12
C12N 5/10
C12N 15/12
C12P 21/00
/(C12P 21/00 , C12R 1:19)
C07K 99:00

(21) Application number: **01028023**(22) Date of filing: **07 . 02 . 89**(71) Applicant: **TONEN CORP**(72) Inventor: **URAGAMI KENICHI**
MIKI KEIZABURO(54) **PEPTIDE RELATING TO PTHRP, PREPARATION AND USE THEREOF**

cultured product.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

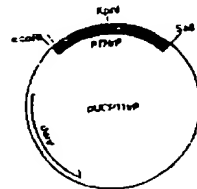
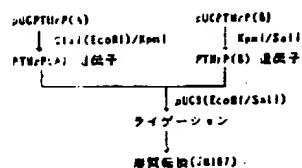
(57) Abstract:

NEW MATERIAL: A polypeptide represented by formula, etc., not having any human parathyroid hormone-relating protein(PTHrP) activity and having an antagonistic activity against the physiological action of the human PTHrP or a peptide having the human PTHrP activity.

USE: A calcium metabolish remedy or a hypercalciuria remedy.

PREPARATION: For example, a PTHrP gene is divided with a restriction enzyme into PTHrP(A) and PTHrP(B), which are synthesized into DNA fragments by a phosphoamidite method, respectively, and subsequently converted into genes corresponding to partial peptides by a ligation reaction. The genes are inserted into cloning vectors, and Escherichia coli transformed with the vectors is cultured. Plasmids are extracted from the strain to give pCU-PTHrP(A) and (B), which are treated with a restriction enzyme and combined with expression vectors. Escherichia coli is transformed with the treated expression vectors and the transformed strain is cultured, followed by providing a polypeptide from the

Ileu Leu His Asp Lys Gly Iys Ser Ile Glu Asp
 Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile
 Ala Glu Ile His Thr Ala



THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑯ 公開特許公報(A)

平2-207099

⑮ Int. Cl.³

C 07 K 7/10
A 61 K 37/24

C 07 K 15/12
C 12 N 5/10
15/12
C 12 P 21/00

識別記号

ZNA
ADD
AEG

庁内整理番号

8318-4H

8615-4C
8318-4H

⑯ 公開 平成2年(1990)8月16日

C

8214-4B
8717-4B
8515-4B

C 12 N 15/00
5/00

A
B※

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全11頁)

⑰ 発明の名称 PTHrP関連ペプチド、その製造法及び用途

⑱ 特 願 平1-28023

⑲ 出 願 平1(1989)2月7日

⑳ 発 明 者 浦 上 研 一 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東亜燃料工業株式会社総合研究所内

㉑ 発 明 者 三 木 敬 三 郎 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東亜燃料工業株式会社総合研究所内

㉒ 出 願 人 東亜燃料工業株式会社 東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

㉓ 代 理 人 弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

PTHrP 関連ペプチド、その製造法及び用途

2. 特許請求の範囲

(1) ヒトPTHrP 活性を有さず、ヒトPTHrP 又はヒトPTHrP 活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗する活性を有するポリペプチド。

(2) 前記ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を含む請求項1記載のポリペプチド。

Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Glu Asp
Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile
Ala Glu Ile His Thr Ala

(3) 上記アミノ酸配列のN末端側にヒトPTHrP のN末端部分配列であるAla Val Ser Glu His Gluを含まない請求項2記載のポリペプチド。

(4) 請求項2記載のアミノ酸配列から成る請求項2記載のポリペプチド。

(5) 請求項1ないし4のいずれか1項に記載のポリペプチドを有効成分とする、ヒトPTHrP に対するカルシウム代謝治療薬。

(6) 請求項1記載のポリペプチドをコードする領域を含み、大腸菌中で該ポリペプチドを発現することができる発現ベクターで大腸菌を形質転換し、該形質転換された大腸菌を培養し、その培養物から上記ポリペプチドを回収することを含む、請求項1記載のポリペプチドの製造法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明は、新規なPTHrP 関連ペプチド、その製造法及びそのカルシウム代謝治療薬としての用途に関する。この発明のアンタゴニストは、高カルシウム血症の治療に用いられる。

〔従来の技術〕

血液中のカルシウム代謝調節因子として代表的なものには副甲状腺ホルモン(Parathyroid Hormone, PTH)、カルシトニン、ビタミンD等があるが、癌が引き起こす高カルシウム血症の原因物質としては、上記のいずれでもないことが指摘されていた。

1987年になりHosoley らにより高カルシウム

血症を呈したヒト扁平上皮癌より、PTHと同じ活性を示すタンパク質が単離され、これは副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (Parathyroid Hormone related Protein, PTHrP) と命名された。また、癌患者における高カルシウム血症の原因物質がこのPTHrPであることも判明した。

さらに、Savaraにより、PTHrPのアミノ酸配列及びcDNA塩基配列が決定されるに至り、PTHrPは141アミノ酸より成るものであることがわかった。Savaraは、得られたcDNAより哺乳類の細胞系でPTHrPを発現させ、PTH活性換算4.8 μ g/lの発現を確認している。

Rodanらは既にヒトPTHrPの1-34番目のペプチドフラグメントを化学的に合成し、ラット骨肉腫由来の細胞株ROS17/2.8におけるアデニレートシクラーゼの活性の増加に関してヒトPTH(1-34)と同様の活性を持つことを確認している。

癌患者における高カルシウム血症は、癌患者全体の約10%に発症するとされ、血中のカルシ

ウム濃度の上昇により疼痛等様々な障害を引き起こすものである。

現在、この高カルシウム血症の治療薬として、カルシトニン関連ペプチドがあるが、その効果は一過性のものであり有効率も低い。これは、カルシトニンは破骨細胞のレセプターに結合し、骨吸収の抑制作用を示すが、高カルシウム血症の原因物質であるPTHrPの活性を抑えるわけではないためであり、従って、その効果にも限界がある。

【発明が解決しようとする問題点】

従って、この発明の目的は、PTHrPに対するアンタゴニストとして作用し、PTHrPにより引き起こされる高カルシウム血症を治療することができる新規なPTHrP関連ペプチド及びその製法を提供することである。

【問題点を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究の結果、ヒトPTHrP活性を有さないが、ヒトPTHrPが結合する骨細胞上のレセプターに結合し、それによってヒ

トPTHrP活性を拮抗する活性を有する新規なポリペプチドを得ることに成功し、この発明を完成した。

すなわち、この発明は、ヒトPTHrP活性を有さず、ヒトPTHrP又はヒトPTHrP活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗する活性を有するポリペプチドを提供する。

また、この発明は、上記ポリペプチドを有効成分とする、ヒトPTHrPに対するカルシウム代謝治療薬を提供する。

さらにまた、この発明は、上記本発明のポリペプチドをコードする領域を含み、大腸菌中で該ポリペプチドを発現することができる発現ベクターで、大腸菌を形質転換し、該形質転換された大腸菌を養い、その培養物から上記ポリペプチドを回収することを含む、本発明のポリペプチドの製造法を提供する。

【発明の効果】

本発明により、癌患者における、ヒトPTHrPにより引き起こされる高カルシウム血症を抑える

効果の高い新規なポリペプチドが提供された。このポリペプチドは、従来の抗PTHアンタゴニストである[Tyr³⁴]b-PTH(7-34)に比較して有意に強くヒトPTH活性を阻害する。

また、本発明の製造法によると、従来のSavaraによる哺乳動物細胞を用いた系に比較して500倍以上の大量のポリペプチドを発現させることができる。

【発明の具体的説明】

上述のように、本発明のポリペプチドは、ヒトPTHrP活性を有さず、ヒトPTHrP又はヒトPTHrP活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗するものである。本発明者らは、鋭意研究の結果、ヒトPTHrPは、そのN末端側から数えて第1目ないし第6番目（以下、特に断りがない限りアミノ酸の位置はN末端から数えて示す）のアミノ酸配列であ Ala Val Ser Glu His Glu が欠落すると、そのPTHrP活性を喪失すること、及び第7番目ないし第34目のアミノ酸配列である Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Glu

Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu
Ile Ala Glu Ile His Thr Ala が存在すればヒト
PTHrP が結合する骨細胞上のレセプターに結合し
てヒト PTHrP の生理学的活性を阻害することがで
きることを見出した。

従って、本発明の好ましい態様においては、
本発明のポリペプチドは、ヒト PTHrP の第1番目
ないし第6番目のアミノ酸配列を含まず、第7番
目ないし第34番目のアミノ酸配列を含むもので
ある。このポリペプチドは、さらなるアミノ酸配
列を含んでいてもよく、例えばヒト PTHrP の第
35番目以降のアミノ酸配列を含んでいてもよい。
さらに、後述の実施例で示すように、宿主と
なる大腸菌中での発現を促進するため、N末端に
種々の大腸菌由来のタンパク質又はポリペプチド
を結合したものであってもよい。もっとも、ヒト
PTHrP の第7番目ないし第34番目のアミノ酸配
列を有するポリペプチドは、抗 PTHrP アンタゴニ
ストとしての活性を有するので、このアミノ酸配
列のみから成っていてもよい。

リペプチドも本発明のポリペプチドに含まれ
る。

本発明のカルシウム代謝治療薬は、上記本発
明のポリペプチドを有効成分とするものである。
本発明のカルシウム代謝治療薬のヒトに対する投
与量は、通常、本発明のポリペプチドの量で 3×10^{-6} モルないし 3×10^{-7} モル程度であり、投与経
路は静脈注射又は筋肉内注射が好ましい。また、
アンタゴニストの具体的な調剤例として、生理食
塩水又はクエン酸緩衝液中に本発明のポリペプチ
ドを 1×10^{-6} M ないし 1×10^{-7} M 含むものを挙げ
ることができる。

本発明のカルシウム代謝治療薬は、カルシウ
ム代謝に異常のある種々の疾病、例えば高カルシ
ウム血症、骨粗しょう症のような骨疾患及び慢性
腎不全による高カルシウム血症の治療に用いるこ
とができる。

本発明のポリペプチドは化学合成又は遺伝子
工学的手法により製造することができる。アミノ
酸の数が40以下の場合には化学合成により製造

なお、一般に、ポリペプチドの生理活性は、
そのポリペプチドを構成するアミノ酸のうち少数
のアミノ酸が置換し、欠落し又は付加された場合
であっても維持されることがあることは当業者に
よってよく認識されているところである。従っ
て、上記ヒト PTHrP の第7番目ないし第34 目
のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換され、欠
失し又はこれに少数のアミノ酸が付加されたもの
であって、ヒト PTHrP 活性を有さず、抗ヒト
PTHrP アンタゴニスト活性を有するポリペプチド
も本発明のポリペプチドに含まれ、特に請求項2
記載のアミノ酸配列を有するものと解釈するもの
とする。また、特にヒト PTHrP の第3番目ないし
第15番目のアミノ酸配列を欠失したものと及びC
末端から数えて第25番目よりもC末端側のアミ
ノ酸を順次欠失したポリペプチドは本発明の目的
を達成するものであることが確かめられてい
る。さらに、アミノ酸が非天然の修飾アミノ酸に
置換されたものであって、ヒト PTHrP 活性を有さ
ず、抗ヒト PTHrP アンタゴニスト活性を有するポ

する方法が便利であるが、アミノ酸数が40を超
えると化学合成が困難になるので遺伝子工学的手
法により合成することが好ましい。

ポリペプチドの化学的合成法はこの分野にお
いて周知であり、市販のペプチド合成機を用いて
行なうことができる。例えばアブライドバイオシ
ステムズ社のモデル430 ペプチドシンセサイザー
を用いてFmoc法により行なうことができる。

遺伝子工学的手法による本発明のポリペプチ
ドの合成は、ポリペプチドをコードする領域を含
み、大腸菌中で該ポリペプチドを発現することが
できる発現ベクターで大腸菌を形質転換し、該形
質転換された大腸菌を培養し、その培養物から上
記ポリペプチドを回収することにより行なうこと
ができる。

上記発現ベクターにおいて、本発明のポリペ
プチドをコードする領域は、本発明のポリペプチ
ドをコードするものであればいかなる塩基配列を
有していてもよいが、発現がスムーズになるよう
大腸菌の使用頻度の高いコドンを使い、バリンド

ローム等の配列を避けることが望ましい。ヒト PTHrP の第7番目ないし第34番目のアミノ酸をコードする塩基配列としては以下の配列が好ましい。

CTG CTG CAC GAC AAA GGT AAA TCT ATC CAA GAT
CTG CGT CGC CGT TTC TTC CTG CAC CAC CTG ATC
GCT GAA ATC CAC ACT GCA

上記本発明のポリペプチドコード領域の上流には大腸菌内での転写効率を高めるプロモーターが存在する。プロモーターは大腸菌由来のものが好ましく、特にトリプトファンプロモーターが好ましい。プロモーターの直下流に前記本発明のポリペプチドコード領域が位置していてもよいが、後述の実施例で示すように、大腸菌 *trpE* タンパク質のような、大腸菌由来タンパク質をコードする領域の下流に上記領域が位置していてもよい。後者の場合には、本発明のポリペプチドは融合タンパク質の形態として得られる。

この発明の発現ベクターは、通常の発現ベクターと同様、抗生物質耐性のような適当な選択

マーカー及び大腸菌内で複製するための複製開始点を有する。さらに、上記本発明のポリペプチドコード領域の下流には転写終結コドンが存在する。これらは例えば pUC9、pBS322 その他の市販の大腸菌用ベクターのものをそのまま利用することができる。

上記発現ベクターは、上記した本発明のポリペプチドコード領域を例えばホスホアミダイト法等の公知の方法により合成し、これを大腸菌用の市販のベクター又は大腸菌内で発現する公知の発現ベクターにクローニングすることにより作製することができる。後述の実施例では、大腸菌トリプトファンプロモーターを有し、大腸菌中で *TrpE* 及び *TGF-α* を発現する pAT-*TrpE*-*TGFα* (特開昭63-28908号記載) に部分的 PTHrP コード領域をクローニングした。

上記発現ベクターを用いた形質転換は従来の大腸菌用ベクターによる形質転換と全く同様に行なうことができる。また、大腸菌の培養条件も従来と同様に行なうことができる。

上記ベクターで形質転換された大腸菌により産生された本発明のポリペプチドは、固体を遠心分離等で集め、周知のリゾチーム処理及び/又は超音波処理等で固体を破壊し、これをゲルろ過クロマトグラフィー等にかけることにより分離精製することができる。分離精製の具体的条件は後述の実施例に詳述する。

【実施例】

以下、この発明を実施例に基づいてより具体的に説明するが、この発明は下記実施例に限定されるものではない。

なお、下記実施例において、それぞれの操作は特に断りがない限り、T. Maniatis, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (1982), Cold Spring Harbor 記載の方法により行なった。

実施例1

(1) クローニングベクターの構築

図2、3に示す通り、PTHrP 遺伝子を (A) と (B) に分割し、それぞれ約60塩基から成る

DNAフラグメントをホスホアミダイト法により合成した。合成したフラグメントを逆相クロマトグラフィーにより精製し、図4に示した通り前半部 (A) についてライゲーション反応を行ない、約200塩基対から成る (A) の部分的ペプチドに対応する遺伝子を得た。さらに後半部 (B) についても同様な操作を行なった。

得られた遺伝子 (A)、(B) の5'及び3'末端はどちらも制限酵素 *EcoRI* 部位及び *SalI* 部位を持ち、それぞれ独立に *EcoRI* 及び *SalI* で消化したクローニングベクター pUC9 に挿入した (図5)。これを用い大腸菌 JH107 株を形質転換し、40 µg/ml のアンピシリン、IPTG 及び X-gal 存在下、L 培地にて一晚培養し、検出株を得た。

得られた検出株よりプラスミドを抽出した後サンガー法により挿入遺伝子の塩基配列を調べ、設計した通りの遺伝子配列を持つことを確認した。この目的とする PTHrP (A) 及び PTHrP (B) を含むクローニングベクターを持つ菌株をそれぞれ pUC-PTHrP (A) 及び pUC-PTHrP (B) と命名した。

(2) 部分ペプチド(A)及び(B)の直接発現ベクターの構築。

以下、部分ペプチド(A)の直接発現ベクターの構築について記載する。

pUC-PTHrP(A)遺伝子断片を抽出し、別途、制限酵素ClaI、Sallで消化した発現ベクターpAT-XのラージフラグメントとT4リガーゼを用いて結合した。これを用い、大腸菌HB101株を形質転換し、40 μ g/mlのアンピシリン存在下、L培地にて一晚培養し、候補株を得た。得られた候補株よりプラスミドを抽出し、制限酵素により目的とする挿入遺伝子を持つ株を得、これをpAT-PTHrP(A)/HB101株とした。

部分ペプチド(B)に付いても同様であり、得られた株をpAT-PTHrP(B)/HB101株とした。

(3) 部分ペプチド(A)及び(B)の融合タンパク質とした発現ベクターの構築。

以下、部分ペプチド(A)について記す。

pUC-PTHrP(A)/JM107株より制限酵素EcoRI、Sallで消化し、約200塩基対のPTHrP(A)遺伝子断

片を抽出し、別途、制限酵素EcoRI、Sallで消化した発現ベクターpAT-XのラージフラグメントとT4リガーゼを用いて結合した。これを用い、大腸菌HB101株を形質転換し、40 μ g/mlのアンピシリン存在下、L培地にて一晚培養し、候補株を得た。得られた候補株よりプラスミドを抽出し、制限酵素により目的とする挿入遺伝子を持つ株を得、これをpAT-PTHrP(A)/HB101株とした。

(5) PTHrPの融合タンパク質の発現ベクターの構築

pUC-PTHrP(A)/JM107株及びpUC-PTHrP(B)/JM107株をそれぞれ、制限酵素EcoRI、KpnI及びKpnI、Sallで切断し、約200塩基対のPTHrP前半部分遺伝子と約210塩基対の後半部分遺伝子を得た。両者及び制限酵素ClaI、Sallで消化した発現ベクターpAT-TrpE-TGF- α のラージフラグメントをT4リガーゼを用い結合した。これを用い大腸菌HB101株を形質転換し、40 μ g/mlのアンピシリン存在下、L培地にて一晚培養し、候補株を得た。得られた候補株よりプラスミドを抽出し、制限酵素による解析の結果、PTHrP遺伝子の挿入を確認し、この株をpAT-TrpE-PTHrP(HB101)株とした。

(6) 各種ベクターの発現

構築した発現ベクターを含む上記pAT-PTHrP(A)/HB101株、pAT-PTHrP(B)/HB101株、pAT-

TrpE-PTHrP(A)/HB101株、pAT-TrpE-PTHrP(B)/HB101株、pAT-PTHrP(A)/HB101株又はpAT-TrpE-PTHrP(A)/HB101株について上記と同様の条件下で培養を行ない、融合タンパク質の発現を調べた。

(4) PTHrPの直接発現ベクターの構築

pUC-PTHrP(A)/JM107株及びpUC-PTHrP(B)/JM107株をそれぞれ制限酵素ClaI、KpnI及びKpnI、Sallで切断し、約200塩基対のPTHrP前半部分遺伝子と、約210塩基対の後半部分遺伝子を得た。両者及び制限酵素ClaI、Sallで消化した発現ベクターpAT-XのラージフラグメントをT4リガーゼを用い結合した(図6)。これを用い大腸菌HB101株を形質転換し40 μ g/mlのアンピシリン存在下、L培地にて一晚培養し、候補株を得た。得られた候補株よりプラスミドを抽出し、制

TrpE-PTHrP(A)/HB101株、pAT-TrpE-PTHrP(B)/HB101株、pAT-PTHrP(A)/HB101株又はpAT-TrpE-PTHrP(A)/HB101株について上記と同様の条件下で培養を行ない、融合タンパク質の発現を調べた。

以下、pAT-TrpE-PTHrP(A)/HB101株について記載するが、他の株についてもその処理は実質的に同じである。

pAT-TrpE-PTHrP(A)/HB101株を40 μ g/mlのアンピシリンを含む3.2mlのL培地中で一夜培養した後、3.2 μ lの0.5%カザミノ酸を含むM9培地に接種し、37℃で培養し、500nmにおける吸光度が0.5になるまで培養したところでインドールアクリル酸を最終濃度30 μ g/ μ lになるように加え、さらに20時間培養を継続した後、遠心分離により6gの固体を集めた。

集めた固体を2 μ g/mlのリゾチーム、2 mM EDTA及び100 mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)を含む溶液中に懸濁し、0℃、30分間放置した。さらに β -メルカプトエタノール35 μ lを加え、

超音波処理を行ない固体を粉砕した。一晩攪拌した後遠心分離により可溶性成分である上清と不溶性成分である沈殿に分離し、それぞれ、Swank と Munro の方法に従い、8 M 尿素存在下 15 % SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なったところ可溶性及び不溶性成分にそれぞれ 9 : 1 の割合で目的とする PTHrP(A) タンパク質の発現を確認した。また、PTHrP の 1~34 アミノ酸長の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体を用い発現を調べたところ 30 ng/μl 以上の PTHrP(A) の発現量が免疫学的活性として得られた。得られた可溶性成分を凍結乾燥し、セファデックス G-75 (ファルマシア社製) ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより分離精製した。ゲルろ過の具体的条件は溶出液: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), カラム: φ2.5 x 100 cm, 流速 2 ml/15 分であった。溶出成分を集め、凍結乾燥を行ない、臭化シアンにより TrpE 部分を除去、切断した。これは、70 % 酢酸中にタンパク質濃度が 1 % になるように PTHrP を加え、臭化シアンを 100 当量加え、37℃

で、"Acta Endocrinologica", vol. 116, p. 113, (1987) を Ham's F12 培地で 2 日間培養した。F12 培地 (Tris 10 mM, SSA 0.1%, IBMX 0.5 mM を含む) で洗った後、濃度を定めたヒト PTHrP(7-34)NH₂、フラグメント及びヒト PTHrP(1-34)NH₂ を加え、37℃、10 分間インキュベートした。氷上、1M HCl を加えた後、細胞を集め、上清を市販 (ヤマサ社製) の CAMP RIA のキットで濃度を定量化した。

その結果、ヒト PTHrP(1-34)NH₂ に対するヒト PTHrP(7-34)NH₂ の拮抗作用は従来のヒト PTH に対するアンタゴニストである [Tyr³⁴]bPTH(7-34) に比較し、非常に優れていることが判明した。

図 8 は、PTHrP 活性を持つ PTHrP(7-34) の ROS17/2.8 細胞に対するアデニレートシクラーゼ活性 100 とした時の各種 PTHrP 合成フラグメントの阻害効果調べた図で、PTHrP(7-34)NH₂ が最も強く阻害し、アンタゴニストとして優れていることを示している。

さらに、図 9 は、PTHrP(1-34) の濃度を高く

で 24 時間放置することにより行なった。さらに、セファデックス G-50 (ファルマシア社製) を用いゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行なった。このゲルろ過の具体的条件は、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、カラム: φ2.5 x 100 cm, 流速 2.2 ml/15 分であった。溶出成分を集め、凍結乾燥を行ない、20 mg の PTHrP(A) タンパク質を得た。このものの純度は逆相カラムクロマトグラフィー及び SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により単一のものであることを確認した。

実施例 2

アブライドバイオシステムズ社のモデル 438 ペプチドシンセサイザーを用いて Fmoc 法によりヒト PTHrP(7-34)NH₂ を合成した。

合成したヒト PTHrP(7-34)NH₂ についての *in vitro* 及び *in vivo* の効果を試験した。

in vitro における拮抗作用

方法:

ラット骨肉腫由来細胞株 ROS17/2.8 (受託番

であることを示している図で、この結果より、PTHrP(7-34)NH₂ が確かにアンタゴニストとして作用していることが証明できた。

ROS17/2.8 を上記と同様に培養し、HBSS で洗浄した後、一定量の [¹²⁵I]-PTHrP(1-34)NH₂ と濃度を定めたラベルをしていないヒト PTHrP(7-34)NH₂、フラグメントを加え、2 時間室温でインキュベートした。1M NaOH で溶出し、γ カウンターによりレセプター結合した [¹²⁵I] PTHrP(1-34)NH₂ の濃度を測定した。その結果、ヒト PTHrP(7-34)NH₂ は従来のアンタゴニストである [Tyr³⁴]bPTH(7-34)NH₂ に比較し、レセプター結合能が優れていることがわかった (図 10)。

in vivo での効果

ヒト高カルシウム血症を呈した患者より得た 2 種の腫瘍培養株 Lu81 (肺腺癌上皮癌) 及び Fujoka (肺癌) を植え、高カルシウム血症を呈したマウスによるモデル実験系を用いて試験を行なった。

ヒト PTHrP (7-34) NH₂ を 0.1% BSA 含有クエン酸緩衝液 (pH6.5) 1 ml に溶解し、マードマウスの尾静脈より 10 μg/マウスに成るように投与した。投与期間は Lu61 細胞については投与 3 時間後及び 5 時間後に連続投与し、Fujoka 細胞については最初のみとした。

直後及び図 11 及び図 12 にそれぞれ示す点において採血し、血清カルシウム濃度を原子吸光により測定した。

その結果、ヒト PTHrP (7-34) NH₂ は正常マウスには作用せず、Lu61、Fujoka を移植し、高カルシウム血症を呈したマウスにのみ、36 時間以上の長期間にわたりカルシウム濃度を正常レベルまで低下した (図 11 及び図 12)。10 μg/マウスはヒトに換算すると 500 μg/ヒトになり、実際の治療薬としても問題のない量であった。

以上のように、本発明の治療薬は 1 回の投与に対して数十時間以上の持続効果があり、驚くほど優れており、骨疾患及び中枢神経が関与する疾患の治療薬としてあるいは臨床診断薬として有用

及び腫瘍細胞をマードマウスに植えて高カルシウム血症を呈させた場合における本発明の治療薬の高カルシウム血症治療効果を示す図である。

特許出願人 東亜細亜工業株式会社

特許出願人代理人 弁理士 谷川 英次郎



である。

4. 図面の簡単な説明

図 1 はこの発明の発現ベクターにおける、PTHrP コード領域付近の制限酵素地図。

図 2 及び図 3 は、それぞれ PTHrP (A) 及び PTHrP (B) をコードする置換子の塩基配列を示す図。

図 4 ないし図 7 はこの発明の発現ベクターの構築の操作を説明するための図。

図 8 は PTHrP 活性を持つ PTHrP (7-34) の R0517/2.8 細胞に対するアデニレートシクラーゼ活性 100 とした時の各種 PTHrP 合成フラグメントの阻害効果を示す図。

図 9 は種々の濃度の PTHrP (1-34) に対して種々の濃度の PTHrP (7-34) NH₂ を加えた時のサイクリック AMP の量を示す図。

図 10 は、この発明のヒト PTHrP (7-34) 及び従来のアンタゴニストのレセプターに対する特異的結合能の強さを示す図。

図 11 及び図 12 は、それぞれ肺腫平上皮癌

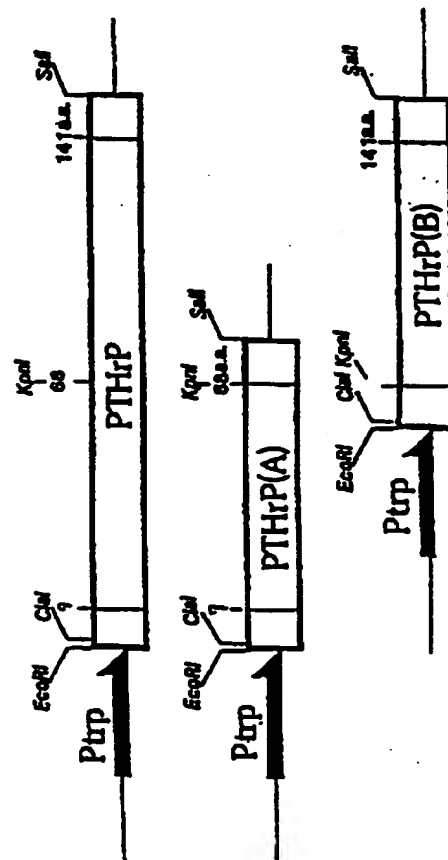


図 1

PTHrP (A)

EcoRI GAATTC ATG ATG CTG CTG CAC GAG AAA GGT AAA TCT ATC CAG GAT CTG CCG CGT
 Ile Asp Met Leu Leu Ile Asp Lys Gly Lys Ser Ile Glu Asp Leu Arg Arg
 PstII
 TTC CTG CAC CAC CTG ATC GGT GAA ATC CAC AGT GCA GAA ATC CCG CCG ACC TCT GAA
 AAC AAG CAC CTG CTG CAC TAG CCA CTT TAG CTG TGA CCG CTT TAG CCA CCA TCG ACA CTT
 Phe Phe Leu Ile Ile Ile Leu Ile Ala Glu Ile Ile Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu
 GTT TCT CCG AAG TGT AAA CCG TCT CCG AAG ACC AAA AAG CAC CCG CTT CCG TTC GGT TCT
 CAA AGA GCG TTG AGA TTT CCG AGA GCG TTG TCG TTT TTG GTG GCG CAA GCA AAG ACA AGA
 Val Ser Pro Asn Ser Lys Pro Ser Pro Asn Thr Lys Asn Ile Pro Val Arg Phe Gly Ser
 KpnI SalI
 CAC GAA GAA GGT CCG TAG CTG TAA TAA G
 CTG CTG CTT CCA CCG AAG GAC ATT ATT CAG CT
 Asp Asp Glu Gly Arg Tyr Leu STP STP

図 2

PTHrP (B)

EcoRI GAATTC ATG ATG CTG CTG CAC GAG AAA GGT AAA TCT ATC CAG GAT CTG CCG CGT
 Ile Asp Met Arg Tyr Leu Thr Glu Thr Asn Lys Val Glu Thr Tyr Lys Glu
 SmaI
 CAC CCG CTG AAA ACC CCG CCG GGT AAA AAG AAA GGT AAA CCG GGT AAA CCG AAA GAA CAG
 GTC CCG GAG TTT TCG CCG CCA TTT TTT TTT CCA TTT CCG CCA TTT CCA TTT CTT CTT CTT
 Glu Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 MluI
 GAA AAA AAG AAA CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG
 CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
 Glu Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 BamHI
 CAG GAA GGT CAC CAC CTG TCT CAG ACC TCT ACC ACA CCG CTG GAA CCG TCT CCG CCG
 GAG CTT CCA CTG CTG CAC AGA CCG TCG AGA TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG
 Leu Glu Gly Asp Ile Leu Ser Asp Thr Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 SalI
 CAC TAA TAA G
 CTG ATT ATT CAG CT
 Ile STP STP

図 3

ライゲーション PTHrP (A)

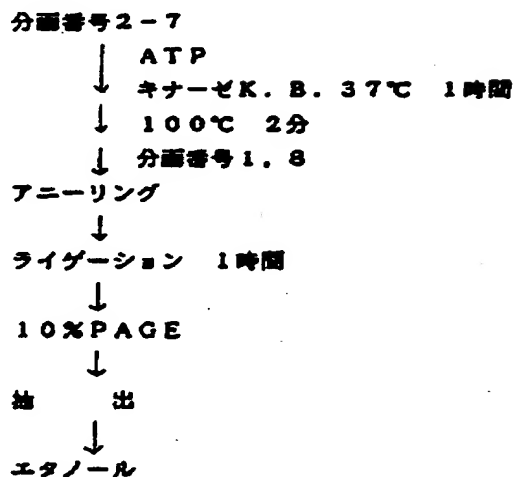


図 4

合成 PTHrP (A/B) 遺伝子
 pUC9 (EcoRI/SalI)
 ↓
 ライゲーション
 ↓
 変異転換 (JM107)

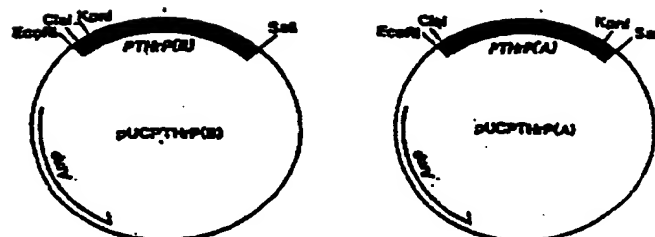


図 5

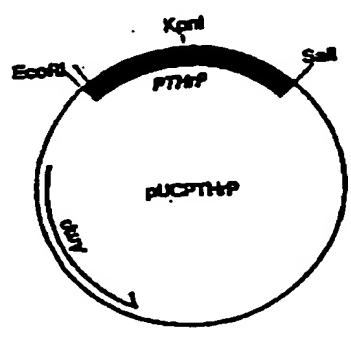
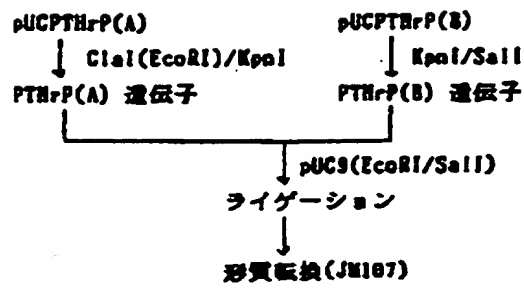


図 6

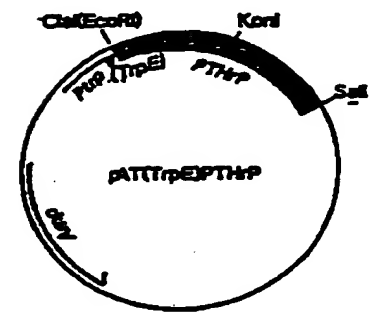
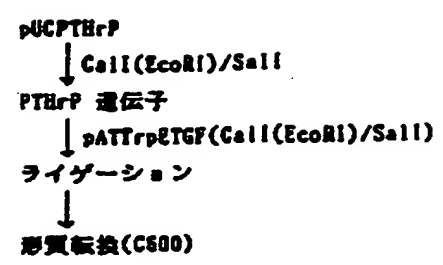


図 7

PTHrP分泌効率と活性の相関

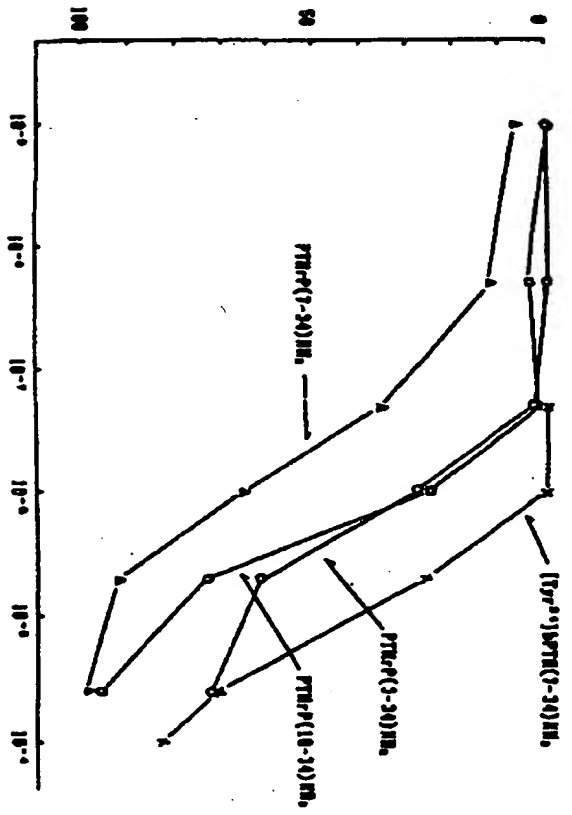


図 8

特異的結合

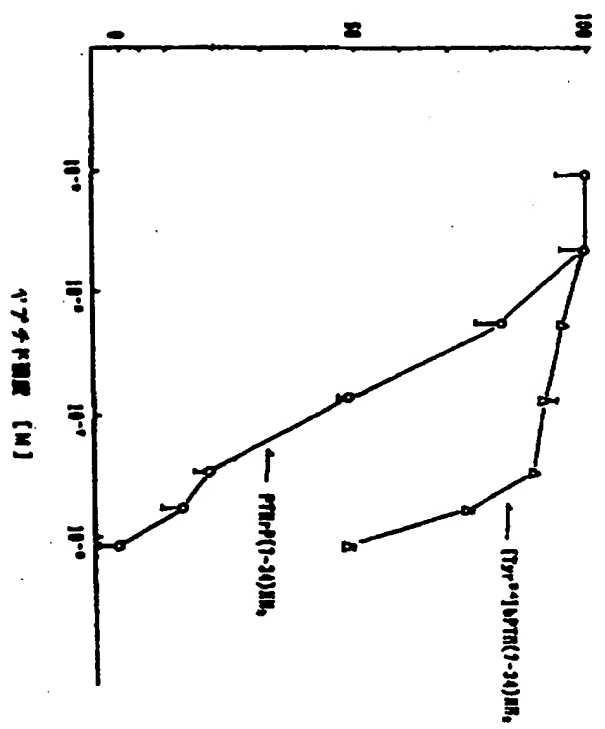
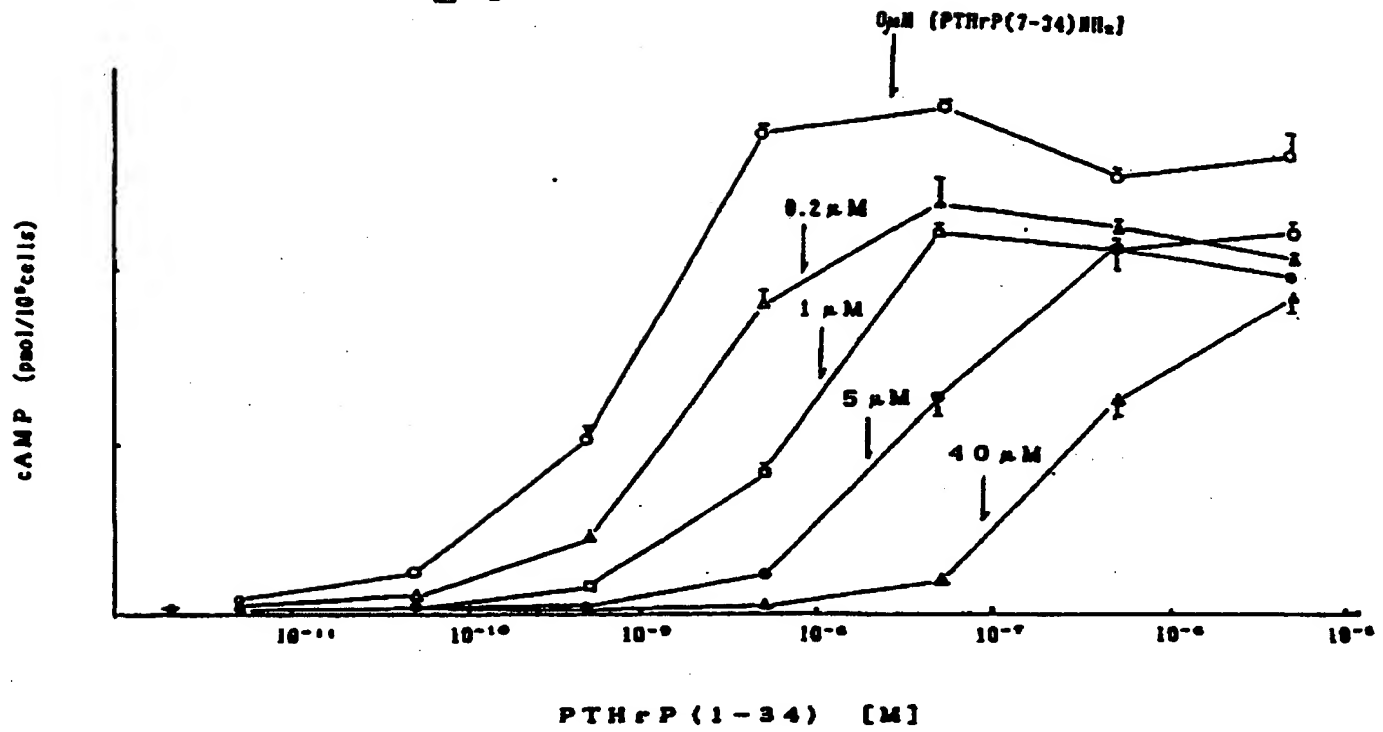


図 10

図 9



カルシウム (mg/dl)

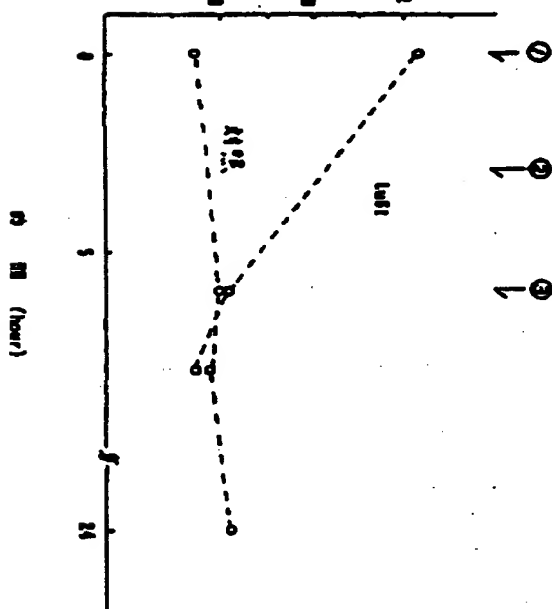


図 11

カルシウム (mg/dl)

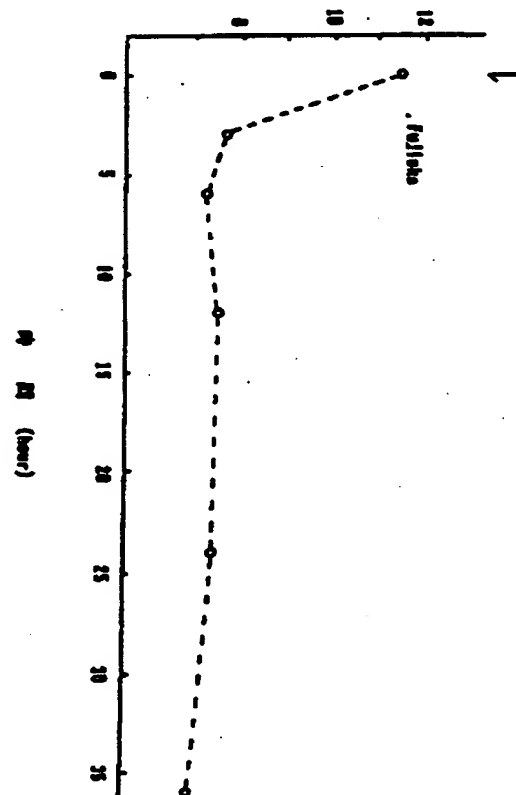


図 12

第1頁の続き

Int. Cl. 1

識別記号

庁内整理 号

#(C 12 P 21/00
C 12 R 1:19)
C 07 K 99:00

THIS PAGE BLANK (USPTO)